DOI:10.11931/guihaia.gxzw202312021[1]

代谢组与转录组联合解析赤皮青冈叶片黄化变异机制

林　立[1], 何月秋[1], 王　豪[2], 陆云峰[2], 王建军[2], 黄华宏[3]

（1. 宁波城市职业技术学院 景观生态学院, 浙江 宁波 315199; 2. 宁波市农业技术推广总站, 浙江 宁波 315100; 3.浙江农林大学, 杭州 311300）

摘　要：为揭示赤皮青冈叶色黄化变异机制，该研究以赤皮青冈叶色变异植株和正常植株的叶片为试验材料，采用超高效液相色谱串联质谱法和高通量 RNA 测序技术分别进行代谢组和转录组分析。结果表明：（1）代谢组在正、负离子模式下分别检测出正常植株和突变体之间存在 257 个和 357 个显著差异代谢物（significantly changed metabolites，SCMs），其中槲皮素、白矢车菊素、杨梅素等多种黄酮类化合物及其糖苷衍生物（吡喃酮啡肽 A、异鼠李素 3-葡糖苷酸等）在突变体中显著上调，而叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素等色素含量则显著下降。（2）转录组测序检测出 4 146 个差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs），其中 1 711 个基因上调表达，2 435 个基因下调表达。（3）KEGG 富集分析表明，SCMs 和 DEGs 显著富集到光合作用、卟啉与叶绿素代谢、类黄酮生物合成等途径。研究结果表明突变体叶色黄化可能是受到叶绿素合成受阻、叶绿体发育异常以及黄酮物质合成增加等因素的综合作用。此外，*MYB* 和 *bHLH* 家族基因在突变体中显著上调，证实该两类转录因子参与调控类黄酮生物合成。该研究结果为植物黄化突变的分子机制提供了新的见解，也为叶色功能基因挖掘与园林植物育种工作提供了参考。

关键词：赤皮青冈，叶色突变体，黄化，代谢组，转录组

中图分类号：Q943　　　　　　　**文献标志码**：

Combined metabolome and transcriptome analyses reveal the albino mechanism of gold-coloured mutant leaves of *Cyclobalanopsis gilva*

LIN Li[1], HE Yueqiu[1], WANG Hao[2], LU Yunfeng[2], WANG Jianjun[2], HUANG Huahong[3]

（1. *School of Landscape Ecology, Ningbo City College of Vocational Technology*, Ningbo 315199, Zhejiang, China; 2. *Ningbo Agricultural Technology Promotion Station*, Ningbo 315100, Zhejiang, China; 3. *Zhejiang Agriculture and Forestry University*, Hangzhou 311300, China）

基金项目：宁波市公益性计划项目（2021S015）；浙江省省院合作林业科技项目（2021SY02）。

作者简介：林立(1985—)，硕士，高级实验师，研究方向为观赏植物开发与利用，(E-mail) linli851111@163.com。

Abstract: In order to reveal the albino mechanism of gold-coloured mutant leaves of *Cyclobalanopsis gilva*, a naturally-occurring leaf-color mutant was used as experimental materials, and the metabolome and transcriptome of mutant leaves and normal green leaves were analyzed by UHPLC-Q Exactive HF-X and high-throughput RNA sequencing, respectively. The results were as follows: (1) 257 and 357 significantly changed metabolites (SCMs) were respectively identified under the positive ion mode and the negative ion mode. Compared with green leaves, the content of some flavonoids such as quercetin, leucoyanidin, myricetin and their derivatives (pyranodelphinin A, isorhamnetin 3-glucuronide, etc.) increased significantly in mutant leaves, but the content of chlorophylls and carotenoids decreased significantly. (2) A total of 4 146 differentially expressed genes (DEGs) were detected, of which 1 711 were up-regulated and 2 435 were down-regulated. (3) KEGG enrichment analysis showed that SCMs and DEGs were mainly enriched in photosynthesis, porphyrin and chlorophyll metabolism and flavonoid biosynthesis. The research results indicate that inhibition of chlorophyll synthesis, chloroplast developmental abnormalities and promotion of flavonoid synthesis were the main factors driving the golden leaf coloration in the mutant *C. gilva*. In addition, the genes of the *MYB* and *bHLH* families were significantly up-regulated in mutant leaves, confirming these two types of transcription factors were involved in regulating flavonoid biosynthesis. This study provided new molecular insights into the phenomenon of leaf etiolation, and also provided reference for exploring leaf color-related functional genes and breeding of landscape plant.

Key words: *Cyclobalanopsis gilva*, leaf-color mutant, albino, metabolome, transcriptome

叶色突变是指植物在生长发育过程中发生的叶色变化现象（刘新亮等，2017）。叶色突变易于鉴别，Gustafsson 最早将其分为条纹、斑点、浅绿、黄化和白化 5 类（Gustafsson，1942），此后 Manjaya 和 Nandanwar（2007）又进一步细分出黄绿、紫叶、类病斑等类型。黄化是其中一种重要的突变类型，黄化突变体常被用于植物光合生理（张晨禹等，2019）、叶绿体超微结构（李淑培，2023）、叶绿素生物合成（Zhu et al.，2014）等方面研究。此外，黄化突变在育种领域也有重要应用，许多“金叶”类园林植物品种都来自于黄化突变，如‘金叶国槐’（*Sophora japonica* ‘Aurea’）；‘中华金叶榆’（*Ulmus pumila* ‘Jinye’）；‘金叶鸡爪槭’（*Acer palmatum* ‘Aurea’）等。目前，有关植物叶色黄化的研究集中于少数模式植物和一些重要的农作物，比如拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）；水稻（*Oryza sativa*）；黄瓜等（Li et al.，2012；Maekawa et al.，2015；熊兴伟等，2023）。在园林植物中，仅在黄山栾树（*Koelreuteria bipinnata* var. *integrifoliola*）（Lyu et al., 2017）；银杏（*Ginkgo biloba*）（Li et al., 2019）；杂交构树（*Broussonetia kazinoki*×*B. papyrifera*）（Wang et al., 2022）等少数植物中有过报道。

近年来，高通量测序技术被广泛用于生物组学研究，能够从分子层面揭示生物现象和生物过程的发生机制（熊兴伟等，2023）。并且，通过多组学的联合应用，可以更加直观地反映机体的变化水平，为生物体静态和动态的变化提供更为深入和广阔的研究视野(陆小雨等，2020）。Lyu 等（2017）通过高通量测序技术，从黄山栾树品种‘金焰彩栾’（*K. bipinnata* var. *Integrifoliola* ‘Jinyan’）中检测出 9 个叶绿素代谢和 14 个类胡萝卜素生物合成的关键基因。Wang 等（2022）采用多组学方法对杂交构树的黄叶突变体进行研究，揭示了金黄叶色表型的形成与光合色素的含量与比例变化以及叶绿体结构和功能缺陷有关。Yamashita 等（2021）对茶树黄化品种（*Camellia sinensis* ‘Koganemidori’）的叶绿素代谢和氨基酸积累机制进行了探究，表明供试品种的黄化表型是由于叶绿体发育和叶绿素合成相关基因缺乏所致，高氨基酸则源于代谢相关基因的上调表达所引起的广泛蛋白质降解。Luo 等（2022）采用转

录组和代谢组联用技术，揭示了甘蔗叶色黄化现象与叶绿素合成途径减少、光合基因表达下降、金属离子调控功能障碍以及次生代谢物质改变等因素有关。总而言之，植物叶色黄化与叶绿素代谢相关基因的突变或表达受阻有重要关系。此外，也会受到花青素、类胡萝卜素等其他色素代谢变化的综合作用（林馨颖等，2022）。

赤皮青冈（*Cyclobalanopsis gilva*）为壳斗科（Fagaceae）青冈属（*Cyclobalanopsis*）常绿乔木，主要分布于我国南方海拔 300~1 500 m 的山林地带（中国植物志编辑委员会，1998）。其木材质地坚硬，纹理细腻，是优良的硬木用材树种，也可用于低山丘陵混交造林、林下补植和园林绿化（欧阳泽怡等，2021；秦之旷等，2023）。本研究团队于 2016 年在宁波海曙溪下育苗基地发现一株赤皮青冈播种变异株，其成熟叶片为黄色，新叶金黄色，枝干明黄色，并于 2018 年底通过嫁接繁殖多株材料，其特异性状已连续 4 年表现稳定。本研究以赤皮青冈黄化突变植株和正常植株的叶片为研究材料，采用代谢组和转录学联用技术同时结合生理生化测定，拟探讨以下问题：（1）赤皮青冈变异植株金黄叶色表型形成的生理机制；（2）变异植株叶色黄化的转录调控机制。本研究可为金叶系园林植物的选育和遗传改良提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以赤皮青冈黄化突变体（Yellow leaf，YL）和正常植株（No yellow leaf，NYL）为研究材料，两种材料均种植于宁波市农业技术推广总站林特基地（121°42′24″E，29°48′46″N）。2021 年 8 月采集两种植株叶片样品（图 1），先置于液氮速冻，后置于-80℃冰箱中保存备用。



图 1　赤皮青冈黄化植株 YL(**A**)和叶色对比图(**B**)

Fig. 1　Gold-coloured mutant YL (**A**) and leaf color contrast (**B**)

1.2 代谢组分析

1.2.1 代谢物提取

称取 50 mg 样品至离心管，加入 400 μL 的甲醇：乙腈（V/V = 1 : 1，含内标）提取液。用冷冻组织研磨仪（Wonbio-96c，上海万柏）进行研磨，提取液静置后在 4℃条件下 13 000 g 离心 15 min，之后取上清液进行上机分析。YL 组和 NYL 组各设置 6 个生物学重复。每个样品取 20 μL 上清液，混合后用于质控分析。

1.2.2 代谢物检测

利用 Thermo Fisher Scientific 超高效液相色谱（UHPLC）串联傅里叶变换质谱（Q Exactive HF-X）进行 LC-MS 分析。色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3（100 mm × 2.1 mm，1.8 μm；Waters，USA）。液相条件：流动相 A 为 95%水 ＋5%乙腈（含 0.1%甲酸），流动相 B 为

47.5%乙腈 +47.5%异丙醇 +5%水（含 0.1%甲酸）。3）洗脱梯度：正离子模式：0 min，A/B（V/V）为 100 : 0；3.0 min，为 80 : 20；4.5 min，为 65 : 35；5.0 min，为 0 : 100；6.3 min，为 0 : 100；6.4 min，为 100 : 0；8.0 min，为 100 : 0。负离子模式：0 min，A/B（V/V）为 100 : 0；1.5 min，为 95 : 5；2.0 min，为 90 : 10；4.5 min，为 70 : 30；5.0 min，为 0 : 100；6.3 min，为 100 : 0；6.4 min，为 100 : 0；8.0 min，为 100 : 0。4）柱温 40℃；进样量 3 μL；流速 0.4 $mL·min^{-1}$。质谱条件：电喷雾离子源（ESI），喷雾电压 3 500 V（正模式）和-3 500 V（负模式）；加热温度 425℃；毛细管温度 325℃；鞘气流速 50 Arb；辅助气流速 13 Arb；扫描范围 70～1 050 m/z；一级分辨率 60 000；二级分辨率 7 500；碰撞能分别为 20、40、60 eV；采用质谱连续扫描采集数据。

1.2.3 数据分析

将原始数据导入 Progenesis v2.2 软件（Waters，USA），通过与 HMDB、METLIN 等代谢数据库比进行代谢物鉴定。利用 R 软件包进行代谢组数据分析和热图制作，对两组样品进行主成分分析（principal component analysis，PCA）和正交偏最小二乘法分析（OPLS-DA），得到模型的变量权重值 VIP（variable important in projection），以 VIP > 1，$P \le 0.05$ 并且 FC（Fold Change）> 1.10 或 FC < 0.91 为标准筛选组间的显著差异代谢物（significantly changed metabolites，SCMs），通过与 KEGG 数据库进行代谢途径富集。

1.3 转录组测序与数据处理

1.3.1 转录组测序及文库构建

采集 YL 和 NYL 的新鲜叶片，参考陆小雨等（2020）方法进行 RNA 提取和质控处理。采用 Truseq™ RNA sample prep Kit（Illumina）的方法构建文库。首先，用带 Oligo（dT）的磁珠分离 mRNA。接着，将 mRNA 随机打断，在 SMART 逆转录酶（SMARTScribeTM Reverse Transcriptase）作用下合成 cDNA 第 1 条链，再利用 RNaseH 将 RNA 链降解，合成 cDNA 第 2 条链。之后，通过 End-Repair Mix 将双链 cDNA 补齐，其 3’末端加 A 处理后连接测序接头。然后，将 cDNA 进行 PCR 富集，再利用 AMPure XP beads 纯化产物。在经过 TBS-380（Picogreen）定量后，按数据比例混合上机。测序时先通过 cBot 平台完成桥式 PCR 扩增，生成簇（clusters），再利用 Ilumina Noveseq 6000 平台完成转录组测序，构建 Ilumina PE 文库（读长 2 bp × 150 bp）。

1.3.2 数据处理

将测序得到的图像信号经 CASAVA 碱基识别转换为原始数据（raw data），经过质控获得到高质量的干净数据（clean data）。采用无参考基因组的转录组分析，通过 Trinity v2.8.5 软件（Grabherr et al., 2011）将 Clean reads 拼接成重叠群（contig）和单一序列（Singleton）。此后，利用 TransRate v1.0.3（Smith-unna et al., 2016）和 CD-hit v4.5.7（Li & Godzik，2006）对初始组装序列进行优化过滤，并利用 BUSCO v3.0.2 软件（Simão et al., 2015）再次评估，得到后续分析的最终转录本。

将转录本与 6 大数据库（NR、Swiss-Prot、Pfam、eggNOG、GO 和 KEGG）比对以获取注释信息。通过 RSEM v1.3.1 软件（Li et al., 2011）计算基因的 TPM（transcripts per million reads）表达量，利用 DESeq2 v1.24.0 软件（Michael et al., 2014）筛选 2 个组的差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs），将阈值差异倍数 FC ≥ 2 且修正 P 值（P adjust）< 0.05 作为筛选标准。以 P adjust < 0.05 为标准，采用 Goatools v0.6.5 软件（Klopfenstein et al., 2018）进行 GO 富集分析和 KEGG pathway 富集分析，筛选参与叶色变化的关键基因。

1.3.3 代谢物与基因相关性分析

采用 Prism 8.0（GraphPad，USA）软件进行 SCMs 与 DEGs 的皮尔森（pearson）相关性分析。以相关性系数$|r| \geq 0.8$ 且 $P < 0.05$ 为阈值，得到 SCMs 与 DEGs 的分子间相互作用关系数据。

1.3.4 qRT-PCR 验证

选用 8 个 DEGs 进行 RT-qPCR 来检验转录组数据的可靠性，利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物（表 1）。以 *CACs*（Accession number：ID6728500）为内参基因（Marum et al., 2012）。设置 3 次生物学重复。将荧光定量表达水平进行 Log_2 转换，与对应基因的转录组表达丰度进行比较。

表 1　qPCR 引物序列

Table 1　Primer sequences for qPCR

基因编号 Gene ID	正向引物序列（5’ → 3’） Forward primer sequence（5’ → 3’）	反向引物序列（5’ → 3’） Reverse primer sequence（5’ → 3’）
CACs	TCTGGGAGAAGAGTGGCTACA	GAGCCACCATTCAAATCCT
FLS	CCTCCTTCCACCATCAACTA	ATGACCTTCAACCCCTAACC
CHS	CAGCAACAAAGGCAATCAA	GACAAGAACACGAGCACCC
UROD	CTTCTTTCTTTGCTCCTTT	GGTCTTTCAACATCTTCCC
psaL	GTCCAATCTGAAAAGCCAA	GTCCAACAAGGAGAAACCC
psaV	CTCTTCCTCCACCTTGTTC	GTGCTTGACTTGGTTTTTG
ELIP	CAACACCTCAGCCACCACA	GCAGCAACAAAGCCAATCA
MYB7	TCACCTGCCAAAGCCCGTT	CCGACCCCATTTTCACCGT
Cab	GGAACTAAAGAATGGGAGG	CAGCAATATGGTCGAAGAG

1.4 叶绿素含量测定

取 YL 和 NYL 的新鲜叶片，经过称量、研磨和过滤后，参照张丽霞等（2021）的方法来测定两组叶片中的叶绿素含量。设置 3 次生物学重复。

1.5 光合参数测定

采用 CI-340 便携式光合作用测定仪（CID，USA）对 YL 突变体和 NYL 植株叶片的净光合作用、气孔导度、胞间 CO_2 浓度、蒸腾速率等光合参数进行测定。设置 3 次生物学重复。

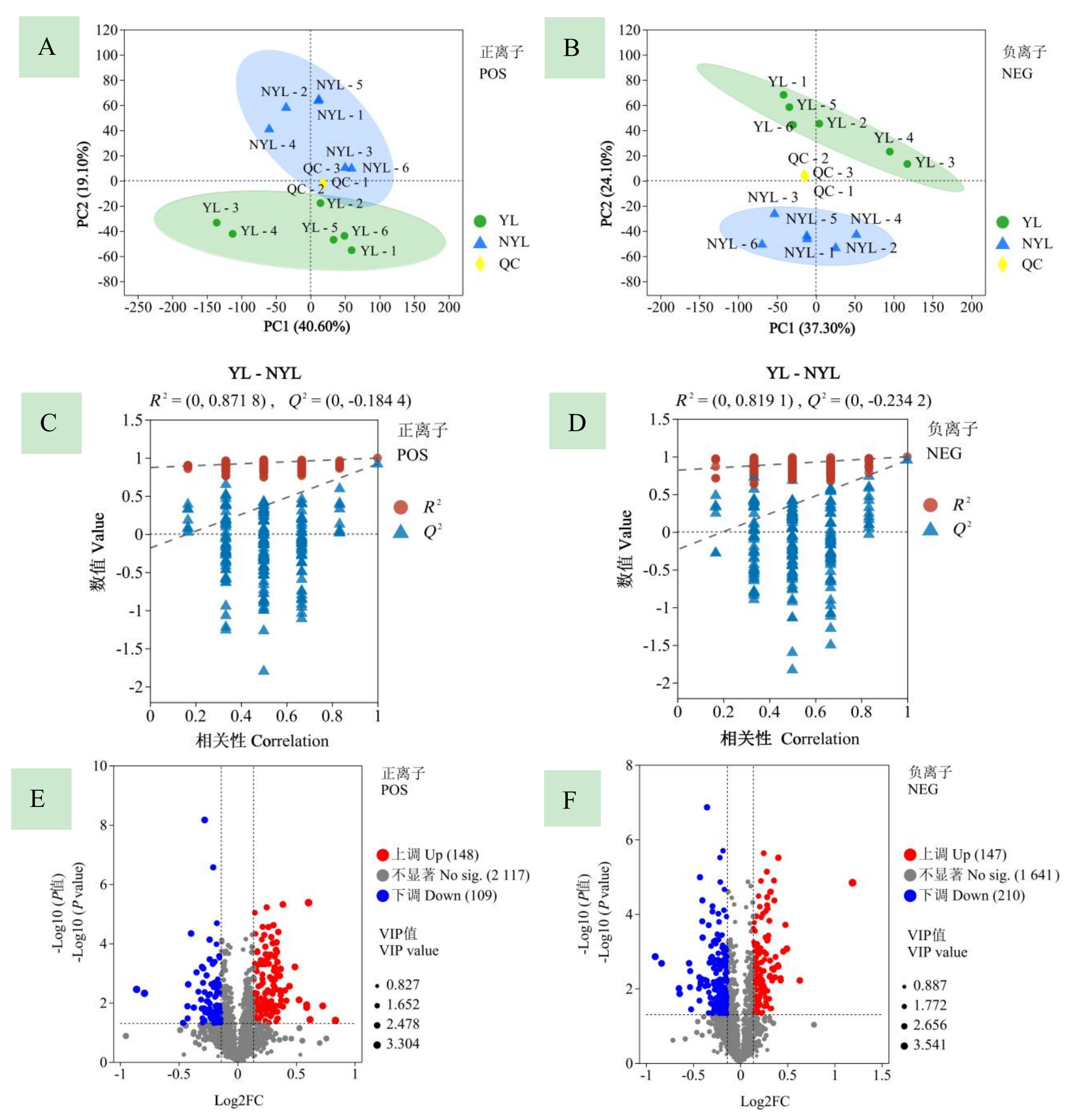
2 结果与分析

2.1 代谢组测序结果与分析

2.1.1 代谢组的多元统计分析

对 YL 和 NYL 两组样本在正、负离子模式下的 UHPLC-Q Exactive HF-X 数据进行代谢物组成的多元统计分析。PCA 分析结果显示，正离子模式下第 1 主成分（PC1）和第 2 主成分（PC2）分别占总变量的 40.60%和 19.10%，负离子模式下第 1 主成分（PC1）和第 2 主成分（PC2）分别占总变量的 37.30%和 24.10%（图 2：A，B）中。OPLS-DA 分析结果显示（图 2：C，D），两种离子模式下差异代谢物 R2 值均高于 Q2 值，且 Q2 与 Y 轴截距小于 0，说明样本数据描述良好。

在正、负离子模式下共鉴定出 614 个 SCMs，其中：正离子模式下 257 个，上调的有 148 个，下调的有 109 个；负离子模式下 357 个，上调的有 147 个，下调的有 210 个（图 2：E，F）。



QC. 质控样本；**VIP**. 变量投影重要性。

QC. Quality control；**VIP**. Variable importance in projection.

图 2　黄化植株 YL 和正常植株 NYL 的 PCA 得分图(A、B)、OPLS-DA 得分图(C、D)和差异代谢物火山图(E，F)

Fig. 2　PCA score plots (A, B) OPLS-DA scores plots (C, D)and volcano plots (E, F) of differential metabolites between YL and NYL

2.1.2 主要的 SCMs 分析

从 614 个 SCMs 中筛选出相对含量前 30 差异代谢物（表 2），其中：黄酮类化合物有 9 种，均在 YL 组表达上调，以吡喃酮啡肽 A 上调最显著，上调 2.28 倍，槲皮素 3-O-（6"-乙酰葡萄糖苷）也上调了 1.55 倍；5 种核苷及其衍生物在 YL 中有差异积累，其中 2 种嘧啶核苷显著上调，3 种嘌呤核苷显著下调；9 种脂类代谢物中，有 5 种在 YL 中受到上调，主要为异戊烯醇脂类；2 种有机酸中，1 种显著上调，另 1 种显著下调。

表 2　YL 和 NYL 组中相对含量前 30 的 SCMs

Table 2　The top 30 SCMs between YL and NYL

编号 No.	代谢物 Metabolite	分类 Class	分子式 Formula	*P* 值 *P* value	VIP 值 VIP value	FC 值 FC value	上调/下调 Up/down
1	吡喃酮啡肽 A Pyranodelphinin A	黄酮类化合物 Flavonoids	$C_{30}H_{33}O16$	1.45E-05	3.541 1	2.280 8	上调 Up
2	槲皮素 3-O-咖啡酰葡萄糖苷 Quercetin 3-O-caffeyl-glucoside	黄酮类化合物 Flavonoids	$C_{30}H_{26}O_{15}$	4.24E-06	3.304 1	1.522 3	上调 Up
3	麦迪考赛德 G Medicoside G	异戊烯醇脂 Prenol lipids	$C_{42}H_{66}O_{16}$	0.039 8	3.186 5	1.784 7	上调 Up
4	异戊烯基腺苷 Isopentenyl adenosine	嘌呤核苷 Purine nucleosides	$C_{15}H_{21}N_5O_4$	0.003 6	3.105 0	0.551 3	下调 Down
5	油酸皂苷 Oleragenoside	异戊烯醇脂 Prenol lipids	$C_{42}H_{64}O_{16}$	0.037 2	2.858 2	1.535 8	上调 Up
6	脱氧尿苷 Deoxyuridine	嘧啶核苷 Pyrimidine nucleosides	$C_9H_{12}N_2O_5$	0.000 9	2.785 7	1.407 7	上调 Up
7	乳酸菌素 Lactucin	内酯类 Lactones	$C_{15}H_{16}O_5$	0.002 1	2.748 4	0.560 5	下调 Down
8	20-氧代白三烯 E4 20-Oxo-leukotriene E4	脂肪酰 Fatty Acyls	$C_{23}H_{35}NO_6S$	0.012 8	2.738 5	1.655 3	上调 Up
9	乳糖-N-二糖 I Lacto-N-biose I	有机氧化合物 Organooxygen compounds	$C_{14}H_{25}NO_{11}$	0.014 5	2.695 2	1.505 4	上调 Up
10	原花青素 Proanthocyanidins	黄酮类化合物 Flavonoids	$C_{31}H_{28}O_{12}$	0.008 0	2.683 3	1.439 3	上调 Up
11	13E-四聚-16-羧基-LTE4 13E-Tetranor-16-carboxy-LTE4	羧酸及衍生物 Carboxylic acids and derivatives	$C_{19}H_{27}NO_7S$	0.000 6	2.639 3	1.404 2	上调 Up
12	西红花苷Ⅳ Dicrocin	异戊烯醇脂 Prenol lipids	$C_{32}H_{44}O_{14}$	0.009 9	2.618 1	0.637 0	下调 Down
13	槲皮素 3-O-(6"-乙酰葡萄糖苷) Quercetin 3-O-(6"-acetyl-glucoside)	黄酮类化合物 Flavonoids	$C_{23}H_{22}O_{13}$	0.006 1	2.595 0	1.547 9	上调 Up
14	2-脱氧-2,3-脱氢-n-乙酰基神经氨酸 2-Deoxy-2,3-dehydro-n-acetyl-neuraminic acid	羧酸及衍生物 Carboxylic acids and derivatives	$C_{11}H_{17}NO_8$	6.90E-09	2.582 7	0.824 1	下调 Down
15	苯甲酰芍药苷 Benzoylpaeoniflorin	异戊烯醇脂 Prenol lipids	$C_{30}H_{32}O_{12}$	0.002 8	2.575 0	1.359 6	上调 Up
16	飞燕草素-3-O-葡萄糖基-5-O-咖啡酰葡萄糖苷 Delphinidin 3-O-glucosyl-5-O-caffeoylglucoside	黄酮类化合物 Flavonoids	$C_{36}H_{36}O_{20}$	9.24E-05	2.564 7	1.259 5	上调 Up
17	茵陈色原酮 Capillarisin	香豆素及其衍生物 Coumarins and derivatives	$C_{16}H_{12}O_7$	4.85E-06	2.560 3	1.307 9	上调 Up
18	阿萨米卡因 A Assamicain A	黄酮类化合物 Flavonoids	$C_{44}H_{36}O_{22}$	0.000 2	2.552 9	1.262 0	上调 Up
19	溶血磷脂酰肌醇 Lysophosphatidylinositol	甘油磷脂 Glycerophospholipids	$C_{11}H_{21}O_{12}P$	0.000 7	2.544 6	1.290 5	上调 Up

20	2-乙基丁二酸 2-Ethylbutanedioic acid	脂肪酰 Fatty Acyls	$C_6H_{10}O_4$	0.002 1	2.523 5	0.686 5	下调 Down
21	2-（4-氯苯基）-1H-吡唑并[4,3-c]喹啉-3-酮 2-(4-Chlorophenyl)-1H-pyrazolo[4,3-c]quinolin-3-one	唑类化合物 Azoles	$C_{16}H_{10}ClN_3O$	0.000 2	2.457 1	1.255 9	上调 Up
22	UDP-D-芹菜糖 UDP-D-apiose	嘧啶核苷酸 Pyrimidine nucleotides	$C_{14}H_{22}N_2O_{16}P_2$	0.001 2	2.455 7	1.284 6	上调 Up
23	8-氨基鸟苷 8-Aminoguanosine	嘌呤核苷 Purine nucleosides	$C_{10}H_{14}N_6O_5$	4.63E-05	2.447 3	0.760 6	下调 Down
24	葛根素 SA1 Kudzusaponin SA1	异戊烯醇脂 Prenol lipids	$C_{42}H_{68}O_{15}$	0.012 3	2.443 1	1.289 7	上调 Up
25	硫胺素 Thiamine	二氮杂苯 Diazines	$C_{12}H_{17}N_4OS$	0.002 4	2.441 7	0.747 7	下调 Down
26	番石榴苷 Guaijaverin	二芳基庚烷类化合物 Diarylheptanoids	$C_{20}H_{18}O_{11}$	0.000 2	2.432 2	1.182 4	上调 Up
27	茜草素 Cirsimaritin	黄酮类化合物 Flavonoids	$C_{17}H_{14}O_6$	0.003 9	2.418 0	1.285 6	上调 Up
28	异鼠李素 3-葡糖苷酸 Isorhamnetin 3-Glucuronide	黄酮类化合物 Flavonoids	$C_{22}H_{20}O_{13}$	4.12E-05	2.414 2	1.272 8	上调 Up
29	嘌呤霉素 Puromycin	嘌呤核苷 Purine nucleosides	$C_{22}H_{29}N_7O_5$	1.37E-07	2.393 3	0.783 0	下调 Down
30	(-)-表没食子儿茶素 7-葡糖苷酸 (-)-Epigallocatechin 7-glucuronide	黄酮类化合物 Flavonoids	$C_{21}H_{22}O_{13}$	9.87E-05	2.355 7	1.232 3	上调 Up

2.1.3 SCMs 的 KEGG 通路分析

将 YL 和 NYL 的 SCMs 进行 KEGG 富集分析，共富集到 66 条通路，主要包含甘油磷脂代谢、辅助因子生物合成、类黄酮生物合成、ABC 转运蛋白、异黄酮生物合成、氨基糖和核苷酸糖代谢等 13 条代谢通路（图 3）。其中，黄酮类生物合成富集的 SCMs 最多，包括类黄酮生物合成富集 12 个，异黄酮生物合成富集 7 个，黄酮和黄酮醇生物合成富集 4 个，暗示黄酮类物质可能与 YL 叶色黄化有关。此外，甘油磷脂代谢、辅酶合成代谢、ABC 转运蛋白、氨基糖和核苷酸糖代谢以及苯丙烷生物合成等分别富集了 17 个、12 个、7 个、6 个和 4 个代谢物。

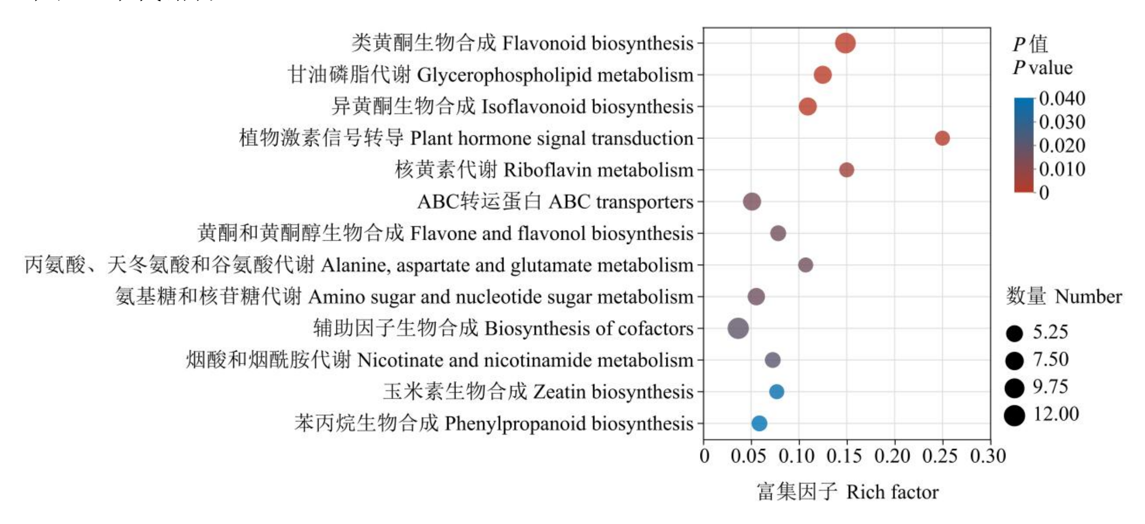


图 3 黄化植株 YL 和正常植株 NYL 差异代谢物的富集图

Fig. 3 Enrichment of different metabolites between YL and NYL

2.2 转录组测序结果与分析

2.2.1 测序质量分析

对 NYL 和 YL 材料的 RNA 进行转录组测序，质控后共获得 44.26 Gb 干净数据（Clean data）（表 3）。各样品的干净序列（Clean read）条数在 43 864 122 和 56 594 944 之间，Q20 值介于 97.61%和 97.79%，Q30 值介于 93.03%和 93.49%，GC 碱基占比在 44.49%和 44.99%之间，满足于后续分析要求。

表 3 转录组测序质量分析

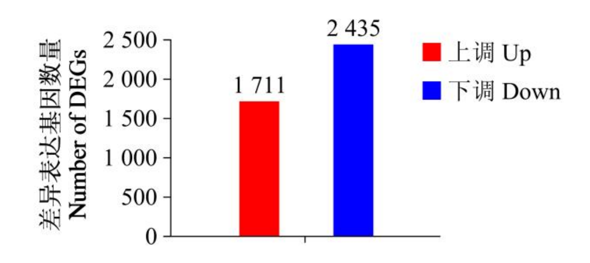
Table 3 Quality analysis of transcriptome sequencing of *Cyclobalanopsis gilva*

样品名称 Sample ID	干净数据 Clean data（bp）	干净序列 Clean reads	错误率 Error rate（%）	Q20 比例 Q20 ratio（%）	Q30 比例 Q30 ratio（%）	GC 含量 GC content（%）
YL-1	6 712 458 677	45 836 326	0.03	97.61	93.03	44.50
YL-2	7 689 229 888	52 647 488	0.03	97.69	93.31	44.99
YL-3	7 372 128 382	50 375 710	0.03	97.64	93.07	44.49
NYL-1	6 381 564 905	43 864 122	0.03	97.70	93.25	44.73
NYL-2	8 227 812 354	56 594 944	0.03	97.74	93.31	44.76
NYL-3	7 871 942 680	53 811 634	0.03	97.79	93.49	44.78

2.2.2 差异表达基因统计

从 YL 和 NYL 的样品中分别鉴定了 46 391 和 48 018 个表达基因，其中 16 699 和 15 072 个基因分别在 YL 和 NYL 中特异表达（图 4：A）。以 NYL 为对照组，在 YL 中共检测到 4 146 个 DEGs，其中 1 711 个上调，2 435 个下调（图 4：B）。





EDGs. 差异表达基因；**Up**. 上调；**Down**. 下调。

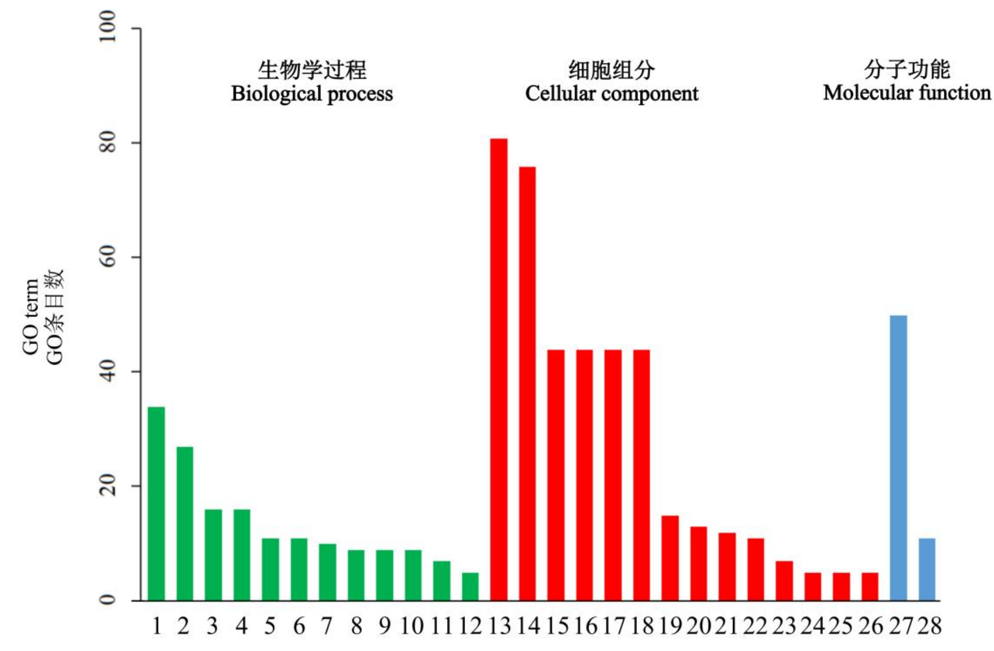
EDGs. Differentially expressed genes; **Up**. Up-regulated; **Down**. Down-regulated.

图 4　YL 和 NYL 组间差异表达基因的韦恩图(A)和差异表达基因上/下调统计图(B)

Fig. 4　Venn diagram (A) and differentially expressed gene up/down regulation (B) between NYL and YL

2.2.3 DEGs 的 GO 功能分析

GO 分析表明，YL 和 NYL 的 3 612 个 DEGs（$P < 0.05$）显著富集到 12 个生物学过程、14 个细胞组分和 2 个分子功能条目（图 5）。在生物学过程中，富集基因最多的是“前体代谢产物和能量产生”，其次为“光合作用”、“色素生物合成过程”、“色素代谢过程”、“卟啉化合物生物合成过程”等，涉及过程多与光合作用或叶绿素合成有关，以下调基因为主，也有少数与磷酸脱氢酶、质体丙酮酸激酶、葡萄糖基转移酶及二氢黄酮醇还原酶相关的代谢途径发生了不同程度上调。在细胞组分中，富集最多的 GO 条目是“质体”和“叶绿体”，其次为“类囊体膜”“光合膜”“叶绿体类囊体膜”等，也以下调基因的数目较多。在分子功能中，存在显著差异的代谢途径最少，仅有“四吡咯结合”和“叶绿素结合”，都以下调基因居多，其中“叶绿素结合”途径当中的下调基因占总数的 90%以上。GO 功能富集分析表明，YL 的叶色黄化突变与光合作用、叶绿素代谢等过程有密切关系。



1. 前体代谢产物和能量产生；**2**. 光合作用；**3**. 色素生物合成过程；**4**. 色素代谢过程；**5**. 卟啉化合物生物合成过程；**6**. 四吡咯生物合成过程；**7**. 光合作用,光捕获；**8**. 光合作用,光系统 I 光捕获；**9**. 叶绿素生物合成过程；**10**. 叶绿素代谢过程；**11**. 细胞对光刺激的反应；**12**. 光合系统 I 中光合电子传输；**13**. 质体；**14**. 叶绿体；**15**. 类囊体膜；**16**. 光合膜；**17**. 叶绿体类囊体膜；**18**. 质粒类囊体膜；**19**. 光系统；**20**. 光系统 I；**21**. 光系统 II；**22**. 光系统 II 放氧复合体；**23**. 质体小球；**24**. 光系统 I 反应中心；**25**. 质体类囊体腔；**26**. 叶绿体类囊体腔；**27**. 四吡咯结合；**28**. 叶绿素结合。

1. Generation of precursor metabolites and energ；**2**. Photosynthesis；**3**. Pigment biosynthetic process；**4**. Pigment metabolic process；**5**. Porphyrin-containing compound biosynthetic process；**6**. Tetrapyrrole biosynthetic process；**7**. Photosynthesis, light harvesting；**8**. Photosynthesis, light harvesting in photosystem I；**9**. Chlorophyll biosynthetic process；**10**. Chlorophyll metabolic process；**11**. Cellular response to light stimulus；**12**. Photosynthetic electron transport in photosystem I；1**3**. Plastid；**14**. Chloroplast；**15**. Thylakoid membrane；**16**. Photosynthetic membrane；**17**. Chloroplast thylakoid membrane；**18**. Plastid thylakoid membrane；**19**. Photosystem；**20**. Photosystem I；**21**. Photosystem II；**22**. Photosystem II oxygen evolving complex；**23**. Plastoglobule；24. Photosystem I reaction center；**25**. Plastid thylakoid lumen；**26**. Chloroplast thylakoid lumen；**27**. Tetrapyrrole binding；**28**. Chlorophyll binding.

图 5　YL 组和 YL 组差异表达基因 GO 富集分析

Fig. 5　GO enrichment analysis on differentially expressed genes in YL and NYL

2.2.4 差异代谢途径的 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析结果显示，共有 744 条 DEGs 被注释到 KEGG 通路，其中 192 条基因显著富集到植物-病原体相互作用、光合作用、乙醛酸及二羧酸代谢等 12 个过程（表 4）。与光合作用相关的途径有 5 条，其中：光合作用-天线蛋白质富集因子最高，为 0.666 7，该通路注释到 10 个基因，全部为捕光叶绿素蛋白复合体（light-harvesting chlorophyll protein complex，LHC）编码基因；富集到光合作用的基因有 23 个，主要涉及光系统的反应中心复合物（reaction-center complex，RCC）；富集到光合生物碳固定途径的有 16 个，包括磷酸丙糖异构酶（triosephosphate isomerase，TIM）、3-磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase，GAPA）等关键酶的编码基因；富集到卟啉和叶绿素代谢的有 12 个；富集到乙醛酸及二羧酸代谢的则有 22 个基因。此外，一些 DEGs 也参与了类黄酮生物合成、花青素生物合成、氨基酸代谢、苯丙烷生物合成等途径。

表 4 YL 和 NYL 间显著富集 KEGG 通路(修正 $P \leq 0.05$）

Table 4 Significantly enriched KEGG pathways between YL and NYL (P adjust $\leq$ 0.05)

编号 No.	通路名称 Pathway	通路 ID Pathway ID	通路注释的差异表达基因 DEGs with pathway annotation	通路注释的所有基因 All genes with pathway annotation	富集因子 Rich factor	*P* 值 *P* value	*P* 修正值 *P* adjust
1	光合作用 Photosynthesis	map00195	23	55	0.418 2	7.01E-15	7.71E-13
2	光合作用一天线蛋白质 Photosynthesis-antenna proteins	map00196	10	15	0.666 7	8.61E-10	4.73E-08
3	植物-病原体相互作用 Plant-pathogen interaction	map04626	62	545	0.113 8	1.79E-07	6.55E-06
4	卟啉与叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyll metabolism	map00860	12	60	0.200 0	0.000 130 233	0.003 581 409
5	乙醛酸及二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	map00630	22	193	0.114 0	0.001 664 845	0.030 522 151
6	光合生物碳固定途径 Carbon fixation in photosynthetic organisms	map00710	16	121	0.132 2	0.001 515 940	0.033 350 685
7	氨酰 tRNA 生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	map00970	17	140	0.121 4	0.002 780 452	0.043 692 822
8	苯丙烷生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	map00940	11	191	0.057 6	0.541 863 137	0.961 370 081
9	花青素生物合成 Anthocyanin biosynthesis	map00942	2	2	1.000 0	0.003 300 317	0.045 379 358
10	类黄酮生物合成 Flavonoid biosynthesis	map00941	10	66	0.151 5	0.004 205 476	0.046 260 234
11	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	map00260	15	121	0.124 0	0.003 944 472	0.048 210 213
12	黄酮和黄酮醇生物合成 Flavone and flavonol biosynthesis	map00944	3	7	0.428 6	0.004 561 683	0.045 616 834

2.2.5 差异转录因子鉴定与分析

转录因子因与功能基因调控区域结合而影响基因表达，会对许多生物学过程产生影响（刘玉飞等，2022）。对 4 146 个 DEGs 中的转录因子基因进行鉴定，共筛得 39 个转录因子相关基因，属于 15 个家族（图 6）。其中，差异基因数目最多的是 MYB 家族（8 个 DEGs），其次为 AP2/ERF 和 bHLH，分别有 5 个和 4 个，WRKY、bZIP 和 SBP 则都有 3 个。15 个转录因子家族中，WRKY、GRAS、AP2/ERF 和 C2H2 以下调基因居多，其他则以上调为主。

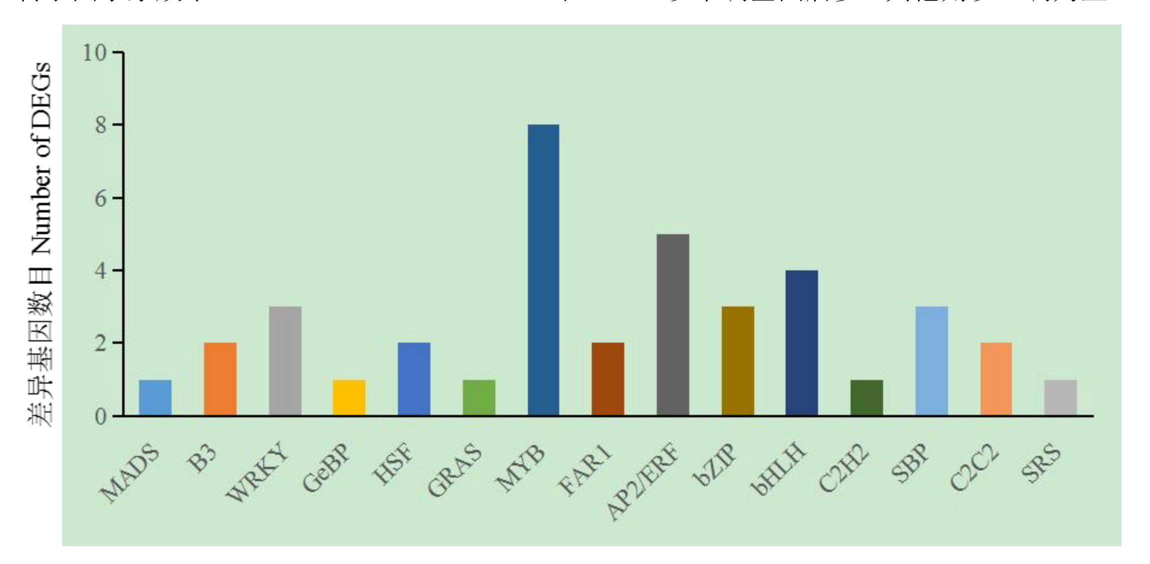


图 6　差异基因中不同转录因子统计分析

Fig. 6　Statistical analysis of transcription factors in DEGs

2.2.6 DEGs 的 RT-qPCR 验证分析

选取 8 个 DEGs 进行 qPCR 验证（图 7）。结果表明，荧光定量表达与转录组基因表达的变化趋势一致，证实转录组数据可靠。

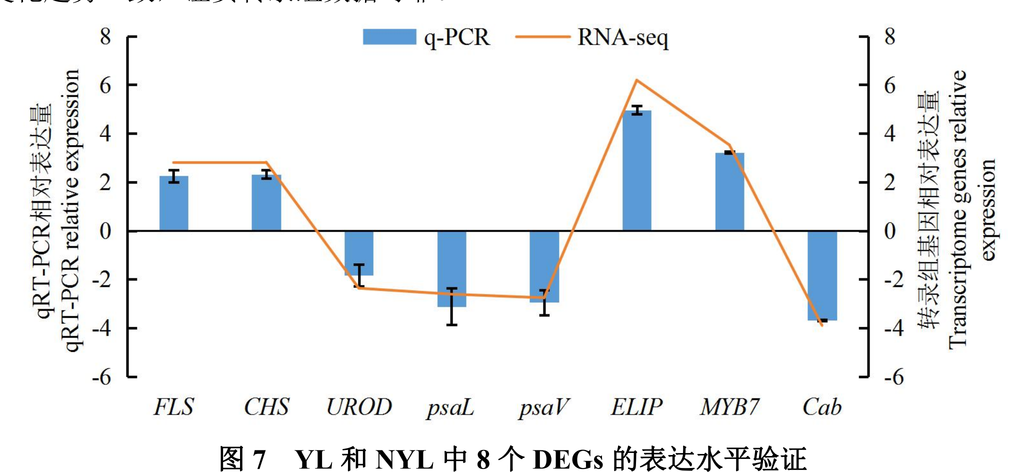


图 7　YL 和 NYL 中 8 个 DEGs 的表达水平验证

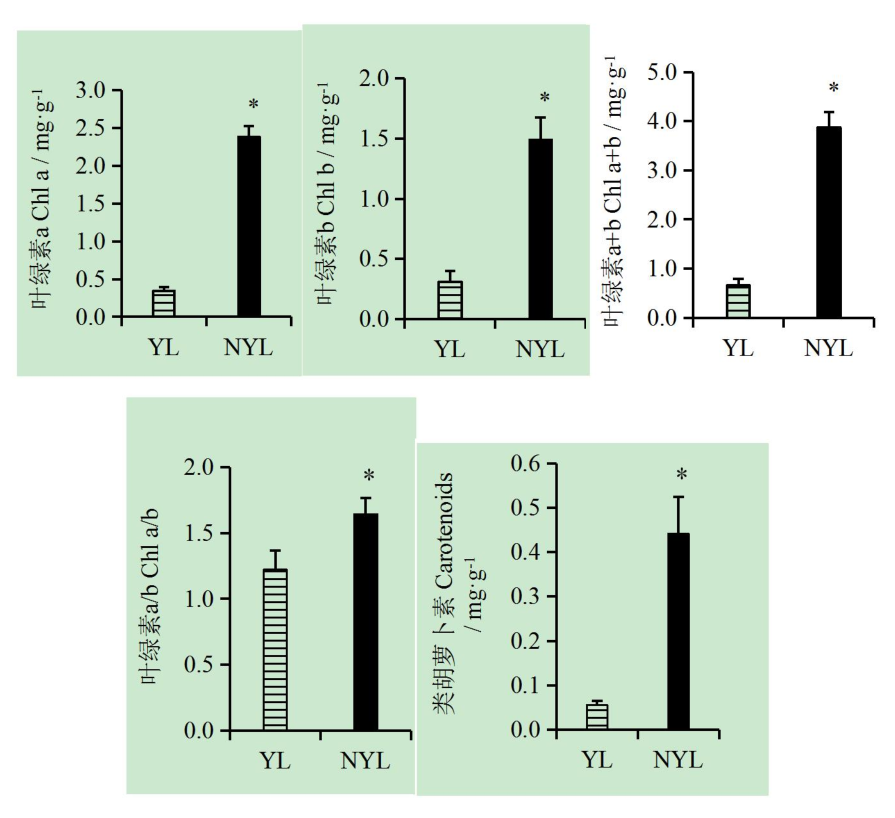
Fig. 7　Verification of expression levels of 8 DEGs in YL and NYL

2.3 YL 的 DEGs 和 SCMs 关联分析

2.3.1 色素代谢相关 DEGs 和 SCMs 的关联分析

植物叶片颜色主要由叶绿素、类胡萝卜素、花青素等植物色素决定（林馨颖等，2022）。通过测定赤皮青冈 YL 和 NYL 的叶绿素和类胡萝卜素含量，发现 YL 中叶绿素 a（0.35 $mg·g^{-1}$）、叶绿素 b（0.31 $mg·g^{-1}$）、总叶绿素（0.66 $mg·g^{-1}$）以及类胡萝卜素（0.05 $mg·g^{-1}$）的含量都

较 NYL（分别为 2.38、1.49、3.87 和 0.44 mg·g^{-1}）显著下降。此外，叶绿素 a/b 的比值也显著降低（图 8），表明 YL 可能受到环境胁迫（Sun et al., 2022）。该比值的变化会造成叶绿素 a 对不同波长吸收的改变，进而也会对叶色产生影响（李丽菁等，2022）。



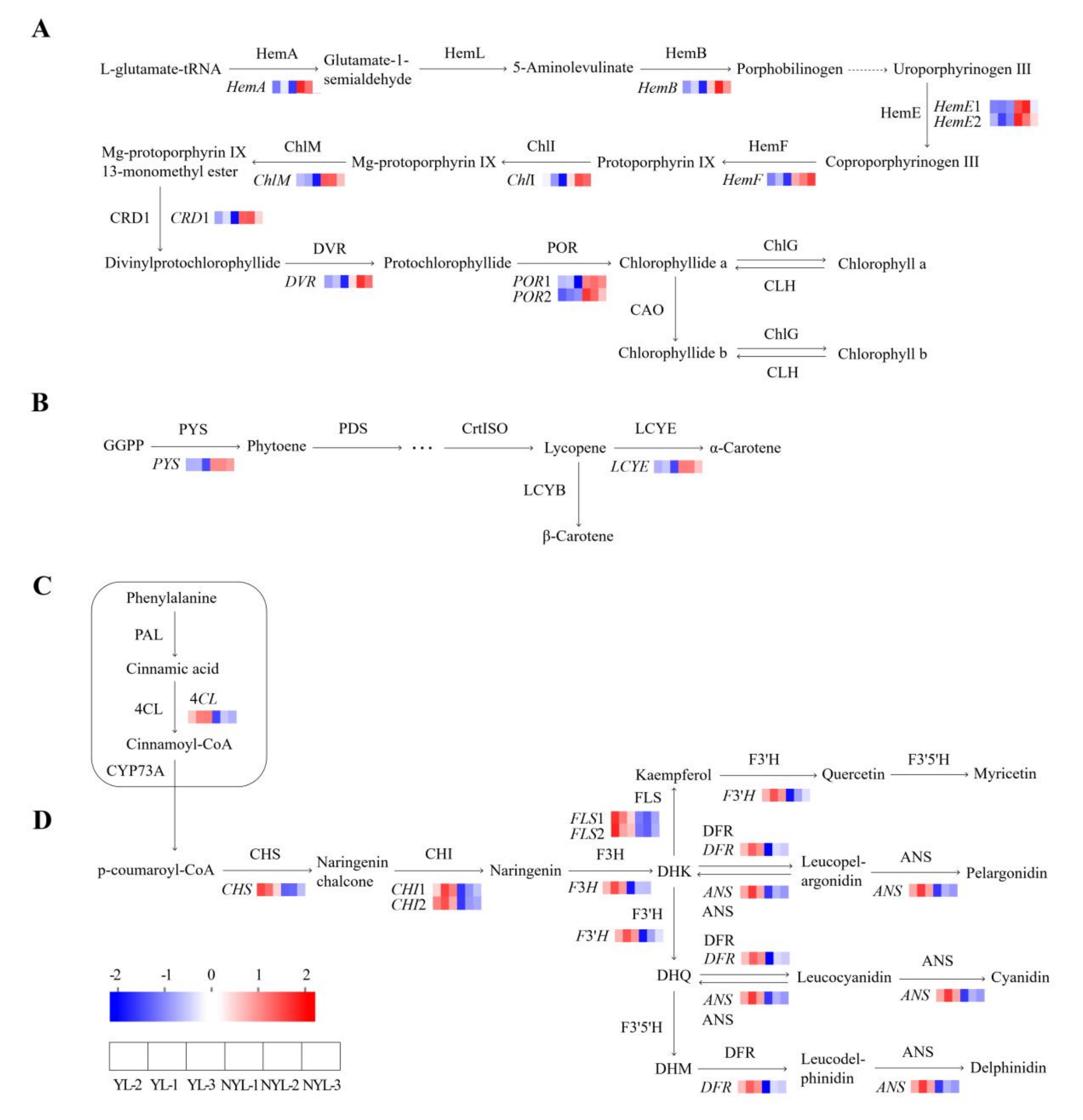
*表示差异显著（$P \leq 0.05$）。

* indicates significant differences（$P \leq 0.05$）.

图 8　YL 和 NYL 的叶绿素和类胡萝卜素含量比较

Fig. 8　Comparison of chlorophyll content and carotenoid pigment content between YL and NYL

在叶绿素合成途径中，谷氨酸-tRNA 还原酶（glutamyl-tRNA reductase，HemA）、尿卟啉原脱羧酶（uroporphyrinogen decarboxylase，HemE）、原卟啉原氧化酶（protoporphyrinogen oxidase，HemF）、原叶绿素氧化还原酶（protochlorophyllide oxidoreductase，POR）等 9 种酶的相关 DEGs 都出现下调表达，其中编码 HemE 的基因下降 4/5，编码 POR 的 2 个基因表达量下调超过 2/3，编码 HemA、HemB（δ-aminolevulinic acid dehydratase）、DVR（divinyl protochlorophyllide a 8-vinyl-reductase）和 ChlI（Mg-chelatase subunit ChlI-1）的基因表达下调都接近 50%（图 9A）。



A. 叶绿素生物合成；**CAO**. 叶绿素酸酯 a 加氧酶；**ChlG**. 叶绿素合酶；**ChlM**. 镁原卟啉IX甲基转移酶；**ChlI**. 镁离子螯合酶亚基 Chl I-1；**CLH**. 叶绿素酶；**CRD1**. 镁原卟啉 IX 甲酯环化酶；**DVR**. 二乙烯还原酶；**HemB**. δ-氨基乙酰丙酸脱水酶；**HemL**. 谷氨酸-1-半醛-2,1-氨基变位酶；**B**. 类胡萝卜素生物合成；**CrtISO**. 类胡萝卜素异构酶；**LCYB**. 番茄红素β-环化酶；**LCYE**. 番茄红素ε环化酶；**PDS**. 八氢番茄红素脱氢酶；**PSY**. 八氢番茄红素合酶；**C**. 苯丙烷生物合成；**PAL**. 苯丙氨酸解氨酶；**4CL**. 4-香豆酸辅酶 A 连接酶；**CYP73A**. 反-肉桂酸 4-单加氧酶；**D**. 类黄酮生物合成；**ANS**. 花青素合酶；**CHI**. 查尔酮异构酶；**CHS**. 查尔酮合酶；**DFR**. 二氢黄酮醇-4-还原酶；**DHK**. 二氢山奈酚；**DHM**. 二氢杨梅素；**DHQ**. 二氢槲皮素；**F3'H**. 黄烷酮 3-单加氧酶；**F3'5'H**. 黄烷酮 F3'5'-羟化酶；**FLS**. 黄酮醇合酶。

A. Chlorophyll biosynthesis；**CAO**. Chlorophyllide a oxygenase；**ChlG**. Chlorophyll synthase；**ChlM**. Mg-protoporphyrin IX O-methyltransferase；**ChlI**. Mg-chelatase subunit ChlI-1；**CLH**. chlorophyllase；**CRD1**. Mg-protoporphyrin IX monomethylester cyclase；**DVR**. divinyl protochlorophyllide a 8-vinyl-reductase；**HemB**. δ-Aminolevulinic acid dehydratase；**HemL**. Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase；**B**. Carotenoid biosynthesis；**CrtISO**. Carotenoid isomerase；**LCYB**. lycopene β-cyclase；**LCYE**. lycopene ε-cyclase；**PDS**. Phytoene desaturase；**PSY**. Phytoene synthase；**C**. Phenylpropanoid biosynthesis；**PAL**. Phenylalanine ammonia-lyase；**4CL**. 4-Coumarate-CoA ligase；**CYP73A**. Trans-cinnamate 4-monooxygenase；**D**. Flavonoid biosynthesis；**ANS**. Anthocyanidin synthase；**CHI**. Chalcone isomerase；**CHS**. Chalcone synthase；**DFR**.

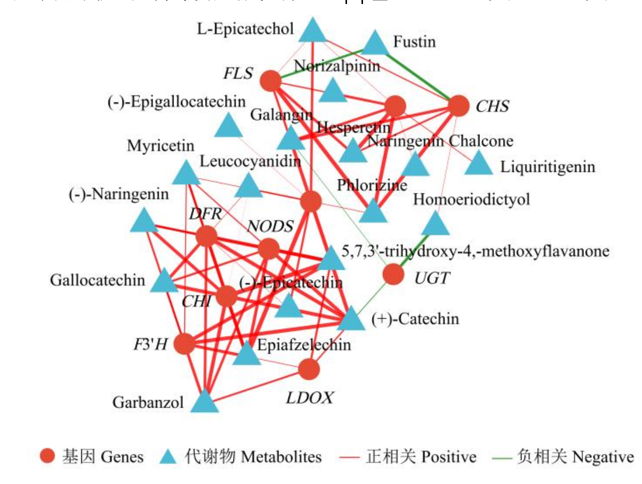
Dihydroflavonol4-reductase；**DHK**. Dihydrokaempferol；**DHM**. Dihydromyricetin；**DHQ**. Dihydroquercetin；**F3'H**. Flavonoid 3'-monooxygenase；**F3'5'H**. Flavonoid 3',5'-hydroxylase；**FLS**. Flavonol synthase.

图 9　YL 组和 NYL 组叶绿素、类胡萝卜素和类黄酮生物合成通路分析

Fig. 9　Analysis of chlorophyll, carotenoid and flavonoid biosynthesis pathway of in YL and NYL

类胡萝卜素也是参与植物光合作用的主要色素之一。YL 中类胡萝卜素含量（0.056 1±0.008 9 $mg\cdot g^{-1}$）较 NYL（0.441 5±0.083 0 $mg\cdot g^{-1}$）显著减少。在类胡萝卜素生物合成途径中（图 9B），八氢番茄红素合酶（phytoene synthase，PSY）是该途径的第 1 个合成酶，编码该酶基因的表达量下降了 4/5，其显著下调会对后续通路产生重要影响。番茄红素ε环化酶（Lycopene ε-cyclase，LCYE）是叶黄素代谢途径中的关键酶，催化线性的番茄红素环化形成胡萝卜素，再进一步合成叶黄素。*LCYE* 基因的表达量也出现显著下降，下调约 4/5，会对叶黄素生物合成产生影响，进而影响突变体的叶色表现。

类黄酮合成的起始代谢物为对香豆酰辅酶 A（p-coumaroyl-CoA），通过苯丙烷生物合成途径产生。在 YL 组中，编码 4-香豆酸辅酶 A 连接酶（4-coumarate-CoA ligase）的基因 *4CL* 表达上调（图 9C），但并未对香豆酰辅酶 A 的含量形成显著影响。在类黄酮生物合成初期阶段，编码查尔酮合酶（chalcone synthase，CHS）和查尔酮异构酶（chalcone isomerase，CHI）的基因表达显著上调，导致柚皮素查尔酮（naringenin chalcone）和柚皮素（naringenin）在 YL 中积累增多（FC = 1.05）。在此后的步骤中，许多关键酶的基因表达水平也显著上调，其中黄酮醇合酶（flavonol synthase，FLS）的基因表达量上调了 6.98 倍，黄烷酮 3-单加氧酶（flavonoid 3'-monooxygenase，F3'H）的基因表达上调 5.77 倍，二氢黄酮醇-4-还原酶（dihydroflavonol4-reductase，DFR）的基因表达水平也显著上调 4.44 倍。这些基因的表达上调，与 YL 中槲皮素（quercetin）、白矢车菊素（leucoyanidin）、杨梅素（myricetin）在内的多种黄酮类化合物的积累有着强相关性（$|r| \geq 0.8$）（图 9D，图 10）。



CHS. 查尔酮合酶编码基因；***CHI***. 查尔酮异构酶编码基因；***DFR***. 二氢黄酮醇-4-还原酶编码基因；***FLS***. 黄酮醇合酶编码基因；***F3'H***. 黄烷酮 3-单加氧酶编码基因；***NODS***. 槲皮素-2-酮戊二酸-3-双加氧酶编码基因；***LDOX***. 无色花色素双加氧酶基因；***UGT***. UDP-糖基转移酶基因。

CHS. Chalcone synthase encoding gene; ***CHI***. Chalcone isomerase encoding gene; ***DFR***. Dihydroflavonol4-reductase encoding gene; ***FLS***. Flavonol synthase encoding gene; ***F3'H***. Flavonoid 3'-monooxygenase encoding gene; ***NODS***. Naringenin, 2-oxoglutarate 3-dioxygenase encoding gene; ***LDOX***. Leucoanthocyanidin dioxygenase encoding gene; ***UGT***. UDP-glycosyltransferase encoding gene.

图 10　YL 和 NYL 中 SCMs 与 DEGs 的互作网络图

Fig. 10　Strong correlations between SCMs and DEGs in YL and NYL

2.3.2 光合作用相关 DEGs 和 SCMs 的关联分析

在光合作用途径中，共有 28 个编码 PS I、PS II 和 LHC 核心蛋白的 DEGs 表达水平发生变化（图 11）。其中，与 PS I 反应中心相关的 8 个 DEGs，都在 YL 中表现下调。与 PS II 反应中心相关的 10 个 DEGs，只有编码 PS II 反应中心 D1 蛋白（photosystem II P680 reaction center D1 protein）的 *psbA* 基因上调，5 个 PS II 放氧增强蛋白（photosystem II oxygen-evolving enhancer protein）和 4 个不同分子量蛋白的 DEGs 都表现为下调。此外，编码叶绿素 a/b 结合蛋白的 10 个基因（*LHCA* 1、*LHCA* 2-1、*LHCA* 2-2、*LHCA* 4、*LHCB* 1-1、*LHCB* 1-2、*LHCB* 2、*LHCB* 4、*LHCB* 6、*LHCB* 7）在 YL 叶片中下调表达。以上结果表明，下调的与光合作用有关的编码基因对 YL 叶片中叶绿体的发育有影响，这与 YL 组叶片叶绿素含量降低的情况相符。叶绿素含量减少，进而引起 YL 组光合速率下降（表 5）。

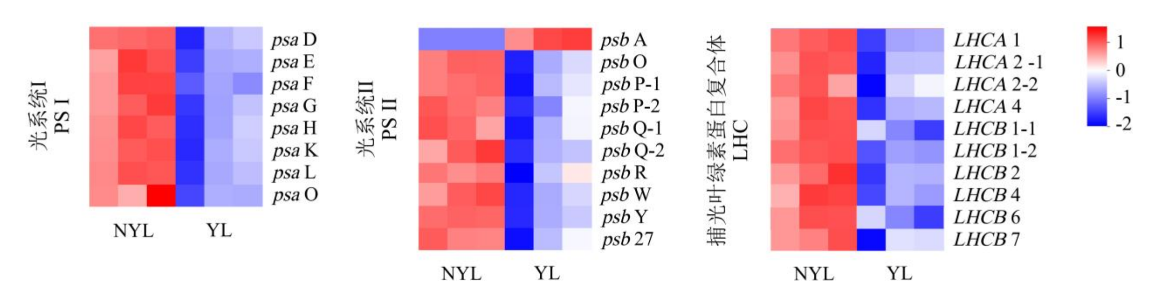


图 11　YL 组和 NYL 组叶绿素、类胡萝卜素和类黄酮生物合成通路分析

Fig. 11　Analysis of chlorophyll, carotenoid and flavonoid biosynthesis pathway of in YL and NYL

表 5　YL 和 NYL 的光合作用参数

Table 5　Photosynthetic parameters of YL and NYL

实验材料 Materials	净光合速率 Net photosynthetic rate (μmol·m^{-2}·S^{-1})	气孔导度 Stomatal conductance (mmol·m^{-2}·S^{-1})	胞间 CO_2 浓度 Intercellular CO_2 concentration (μmol·mol^{-1})	蒸腾速率 Transpiration rate (mol·m^{-2}·S^{-1})
NYL	14.475±0.345	324.46±3.45	238.67±5.32	7.32±1.25
YL	6.350±0.210	278.51±4.62	322.46±2.18	10.46±1.42

3 讨论

3.1 叶绿素合成受阻和叶绿体发育异常导致 YL 叶色黄化

叶色是植物的一个重要性状，其形成涉及许多复杂的生物学过程（Wang et al., 2022）。在高等植物中，叶色表现主要决定于叶绿素代谢过程（吴砚农等，2021），通常是因基因突变引起的叶绿素合成受阻或降解加速，导致植株叶色黄化（朱美玉等，2020）。在 YL 突变体的叶绿素合成过程中，共有 HemA、HemB、HemE、ChlI、POR 等 9 种酶的基因下调表达，涉及从 L-谷氨酰-tRNA 到叶绿素酸酯合成的大多数过程。其中，HemA 催化 L-谷氨酰-tRNA（L-glutamate-tRNA）还原，是调控叶绿素合成的第一个限速反应（Zhao et al., 2014）。HemB 则参与δ-氨基乙酰丙酸（δ-aminolevulinate）向胆色素原转化，也是叶绿素合成的关键步骤（Yang et al., 2015）。*HemA* 和 *HemB* 基因在 YL 中均下调表达，下调约 1/2，推测正是由于该两个前端基因的显著下调导致叶绿素合成的前体物质减少，引起后续反应受阻，进而使叶片整体变色。若突变发生于叶绿素合成的后期基因，则突变体通常形成条纹或斑点状（Sakuraba et al., 2015）。例如，*HemE* 基因突变会导致玉米（*Zea mays*）叶片出现病斑（Hu

et al., 1998），*HemF* 基因突变则会引起玉米叶片黄化坏死（Williams et al., 2006）。此外，*ChlI* 基因表达下调也可能引起 YL 叶色黄化。ChlI 是镁离子螯合酶（Mgch）的三个亚基之一，Mgch 则是叶绿素合成途径（镁分支）中的第一种酶，也是一种关键的限速酶（罗莎等，2015）。已有研究表明。Mgch 亚基编码基因 *ChlI*、*ChlD* 的表达会受该酶底物浓度的影响（Zhang et al., 2006）。在 YL 黄化突变体中，*ChlI* 基因表达量下调约 50%，推测可能是由于其前体—原卟啉 IX（protoporphyrin IX）含量降低所致。并且，该过程也可能进一步抑制后续反应，最终导致 YL 组叶绿素含量显著减少。此外，YL 中类胡萝卜素含量的显著下降，对突变体黄化现象的形成也有一定影响。但是，突变体中叶绿素与类胡萝卜素的比值（Chl/Car）未发生显著改变，两组比值分别为 8.21 和 8.31，暗示 Chl/Car 比值对 YL 的黄叶表型影响不大。

叶绿体结构异常也可能导致植株叶色黄化（江新凤，2021）。在 YL 突变体中，有 33 条与光合作用相关的 DEGs 表达水平发生变化，其中 28 条为 PS I、PS II 的 RCC 和 LHC 的编码基因。*Psa* 和 *Psb* 家族中许多基因的下调表达，可能导致 PS Ⅰ和 PS Ⅱ中相关蛋白的功能受阻。已有研究证实，PS Ⅱ蛋白复合物的显著下调会引起不良基粒的堆叠（熊兴伟等，2023）。LHC 与色素结合起到吸收和传递光能的作用，并能实现光保护，其表达下降会导致叶绿体中基粒堆积异常，引起黄叶表型（Kim et al., 2009）。在对水稻黄叶突变体的研究中，Wu 等（2007）发现叶绿体发育相关基因以及 PS Ⅱ蛋白复合体基因的表达都会受叶绿素合成中间产物的调控。在拟南芥研究中，*LHCB* 基因的表达受到叶绿素合成相关酶（如 Mgch）的反馈调节（Mochizuki et al., 2001）。由此推测，由于叶绿素合成途径受阻，其中间产物和相关酶的含量发生变化，从而抑制了叶绿体光系统中 RCC 和 LHC 的基因表达，影响了类囊体膜结构的形成，导致叶绿体发育异常，以致叶色黄化。此外，叶绿素缺乏与叶绿体发育异常，也导致 YL 突变体捕光能力下降，对光合作用产生不良影响。

3.2 类黄酮物质合成是 YL 叶色黄化的物质基础

采用非靶向代谢组（LC-MS）分析，在 YL 组中共检测到 614 个 SCMs，主要涉及黄酮类、氨基酸、氨基糖或核苷酸糖等。黄酮类物质中的 SCMs 数量最多，有 23 个，包括白矢车菊素、杨梅素、槲皮素等类黄酮化合物及其糖苷衍生物。其中，吡喃酮啡肽 A 在 YL 突变体中上调倍数最大，达 2.28 倍。该物质最早发现于黑加仑种子提取物中（Lu et al., 2000），目前关于其合成途径和形成机制尚不清楚。黄酮类等含氮化合物中形成 SCMs 的积累，表明 YL 突变体中与碳和氮相关的通路发生了代谢重编事件。在 YL 中，参与叶绿素合成、碳固定以及光合作用的 DEGs 主要表现为下调表达（*HemA*、*TIM*、*GAPA*、*LHC* 等），会造成光合作用受阻（表 5），进而导致下游的糖酵解、TCA 循环等碳代谢过程受到抑制（宋建民等，1998）。糖酵解和 TCA 循环的中间体是黄酮类物质碳骨架的主要来源（刘健伟，2016），代谢速率下降会影响类黄酮的生物合成。然而，对代谢组数据的分析表明，两个代谢通路的中间产物及相关酶的含量在 YL 中无显著变化。甚至，YL 组中糖酵解途径的丙酮酸激酶（pyruvate kinase）编码基因表达上调了 3.14 倍，TCA 循环中苹果酸合酶（malate synthase）编码基因表达上调达 20.42 倍，暗示黄化突变并未引起叶片中糖酵解和 TCA 循环的代谢减弱，反而是受到促进。相同现象也在赤霞珠葡萄的黄化突变体中被发现，原因可能是黄化叶片对碳源和氮源的征调能力更强（陈迎春，2011），使得黄酮类物质合成的碳骨架供应充足。此外，由于叶绿素合成受阻，减少了对氮的消耗，氮的积累也可能在一定程度上促进了黄酮类物质的合成与积累，并为 YL 叶色黄化表现的形成提供了物质基础（江新凤，2021）。

3.3 转录因子参与 YL 叶色黄化过程

转录因子对生物的生长发育具有重要的调节作用，许多种类还参与对非生物胁迫的应答（Sun et al., 2022）。在 YL 中，转录因子富集最多的 DEGs 为 *MYB*、*AP2*/*ERF* 和 *bHLH*。已有研究表明，*MYB* 家族转录因子能够介导类黄酮合成途径中许多关键酶的转录，促进黄酮类物质产生（An et al., 2017）。*bHLH* 转录因子则被证实参与对环境胁迫的应答，并能协同 *MYB* 调控类黄酮生物合成（Liu et al., 2018；Wang et al., 2018）。在 YL 组中，CHS、CHI、F3H、FLS 等类黄酮合成关键酶的基因表达上调，可能是受 *MYB* 和 *bHLH* 转录因子的调控。此外，*AP2*/*ERF* 家族 4 个 DEGs 表达发生显著改变，该基因家族主要参与非生物胁迫的应激反应，如强光照、高温、强光等（Wu et al., 2015）。*WRKY*、*HSF* 等与逆境胁迫相关的 DEGs 也出现富集，表明 YL 黄化突变体可能受到环境胁迫。进一步分析胁迫条件，可能源于强光或水分缺失。由于黄化突变体缺少叶绿素（图 8），更容易遭受强光胁迫。江新凤（2021）研究证实强光胁迫能诱导 *MYB* 基因上调并参与植株黄化过程。此外，更快的蒸腾速率也可能使 YL 遭受水分胁迫。YL 的蒸腾速率是 NYL 的 1.42 倍（表 5），蒸腾速率过快易导致植株缺水（张丽霞等，2021）。因此，推测 YL 受到强光或缺水胁迫，诱导 *MYB*、*bHLH* 等转录因子表达上调并参与类黄酮的生物合成，促进黄酮类化合物的产生。

4 结论

本研究通过代谢组和转录组联用技术探索赤皮青冈叶色黄化的形成机制。结果表明，YL 金黄叶色可能是受到叶绿素合成受阻、叶绿体发育异常以及黄酮类物质合成加强等因素的综合作用。此外，在 YL 组还发现 *MYB* 和 *bHLH* 家族的基因表达水平显著上调，证实了该两类转录因子参与调控类黄酮的生物合成。本研究拓展了对赤皮青冈黄叶表型形成机制的认识，为更多“金叶”类型园林植物资源的选育工作提供理论依据。

参考文献：

AN JP, LIU X, LI HH, et al., 2017. Apple *RING E3* ligase *MdMIEL1* inhibits anthocyanin accumulation by ubiquitinating and degrading *MdMYB1* protein[J]. Plant Cell Physiol, 58(11): 1953-1962.

CHEN YC, 2011. The physiological characteristics and related genes of a albino mutant in Cabernet Sauvignon Grapevine[D]. Taian: Shandong Agricultural University: 31-56.［陈迎春, 2011. 赤霞珠葡萄黄化突变体生理特性及相关基因分析[D]. 泰安: 山东农业大学: 33-40.］

Editorial Committee of China Flora of Chinese Academy of Sciences, 1998. Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Tomus 22[M]. Beijing: Science Press: 326.［中国植物志编辑委员会, 1998. 中国植物志: 第二十二卷[M]. 北京: 科学出版社: 326.］

GRABHERR MG, HAAS BJ, YASSOUR M, et al., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nat Biotechnol, 29(7): 644-652.

GUSTAFSSON A, 1942. The Plastid development in various type of Chlorophyll mutations[J]. Hereditas, 28(3-4): 483-492.

HU GS, YALPANI N, BRIGGS SP, et al., 1998. A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype of a dominant disease lesion mimic mutant of Maize[J]. Plant Cell, 10(7): 1095-1105.

JIANG XF, 2021. Identification and evaluation of specific tea germplasm resources in Jiangxi Province and multiomics analysis of shoot etiolation in *Camellia sinensis* var. *Huangjinju*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University: 44-82.［江新凤, 2021. 江西特异茶树资源评价、鉴定及“黄金菊”新梢黄化的多组学分析[D]. 武汉: 华中农业大学: 44-82.］

KIM EH, LI XP, RAZEGHIFARD R, et al., 2009. The multiple roles of light-harvesting chlorophyll *a*/*b*-protein complexes define structure and optimize function of *Arabidopsis* chloroplasts: A study using two chlorophyll *b*-less mutants[J]. BBA-Bioenergetics, 1787(8): 973-984.

KLOPFENSTEIN DV, ZHANG LS, PEDERSEN BS, et al., 2018. GOATOOLS: a python library for gene ontology analyses[J]. Sci Rep, 8(1): 10872.

LI B, DEWEY CN, 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinform, 12(1): 323-323.

LI LJ, ZHANG ZW, XUE Y, et al., 2022. Effects of low temperature stress on chlorophyll metabolism of *Zoysia japonica*[J]. J Beijing For Univ, 44(2): 91-99［李丽菁, 张智韦, 薛云, 等, 2022. 低温胁迫对日本结缕草叶绿素代谢的影响[J]. 北京林业大学学报, 44(2): 91-99.］

LI SP, ZHANG Y, SHE JS, et al., 2023. The characteristics and chloroplast ultrastructure of yellow leaf mutant *chl234* in eggplant[J]. Acta Hortic Sin, 50(5): 1000-1008.［李淑培, 张映, 舒金帅, 等, 2023. 茄子叶色黄化突变体 *chl234* 的特性及其叶绿体超微结构[J]. 园艺学报, 50(5): 1000-1008.］

LI WX, HE ZC, YANG SB, et al., 2019. Construction and analysis of a library of miRNA in gold-coloured mutant leaves of *Ginkgo biloba* L.[J]. Folia Hortic, 31(1): 81-92.

LI WZ, GODZIK A, 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences[J]. Bioinformatics, 22(13): 1658-1659.

LI YH, WANG BH, DAI ZY, et al., 2012. Morphological structure and genetic mapping of new leaf-color mutant gene in rice (*Oryza sativa*)[J]. Rice Sci, 19(2): 79−85.

LIN XY, SHAO SX, WANG PJ, et al., 2022. The albino mechanism of a new theanine-rich tea cultivar ‘Fuhuang 2’[J]. Chin J Biotechnol, 38(10): 3956-3972.［林馨颖, 邵淑贤, 王鹏杰, 等, 2022. 高茶氨酸茶树新品系‘福黄 2 号’黄化变异机理[J]. 生物工程学报, 38(10): 3956-3972.］

LIU JW, 2016. Omics-based study on the metabolism of C/N and biosynthesis of main quality related components in tea plants affected by nitrogen[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences: 1-6. [刘健伟, 2016. 基于组学技术研究氮素对于茶树碳氮代谢及主要品质成分生物合成的影响[D]. 北京: 中国农业科学院: 1-6.]

LIU LL, LI YY, SHE GB, et al., 2018. Metabolite profiling and transcriptomic analyses reveal an essential role of UVR8-mediated signal transduction pathway in regulating flavonoid biosynthesis in tea plants (*Camellia sinensis*) in response to shading[J]. BMC Plant Biol, 18(1): 233.

LIU XL, LI XM, HE XS, et al., 2017. A review: molecular mechanism of plant yellow leaf mutation[J]. J S Agric, 48(8): 1358-1366.［刘新亮, 李先民, 何小三, 等, 2017. 植物叶色黄化突变分子机理的研究进展[J]. 南方农业学报, 48(8): 1358-1366.］

LIU YF, PANG DD, LI YY, et al., 2022. The screening and identification of key transcription factor genes for theacrine metabolism[J]. J Tea Sci, 42(1): 41-50.［刘玉飞, 庞丹丹, 李友勇, 等. 苦茶碱代谢关键转录因子基因的筛选鉴定[J]. 茶叶科学, 2022, 42(1): 41-50.］

LU XY, CHEN Z, TANG F, et al., 2020. Combined transcriptomic and metabolomic analysis reveals mechanism of anthocyanin Changes in Red Maple (*Acer rubrum*) Leaves[J]. Sci Silv Sin, 56(1): 38-54.［陆小雨, 陈竹, 唐菲, 等, 2020. 转录组与代谢组联合解析红花槭叶片中花青素苷变化机制[J]. 林业科学, 56(1): 38-54.］

LU YR, SUN Y, FOO LY. 2000. Novel pyranoanthocyanins from black currant seed[J]. Tetrahedron Lett, 41(31): 5975-5978.

LUO S, LUO T, PENG P, et al., 2015. Activity regulation and functions of Mg chelatase[J]. Plant Physiol J, 51(6): 806-812.［罗莎, 罗韬, 彭鹏, 等, 2015. 镁离子螯合酶活性调控及其功能[J]. 植物生理学报, 51(6): 806-812.］

LUO T, ZHOU ZF, DENG YC, et al., 2022. Transcriptome and metabolome analyses reveal new insights into chlorophyll, photosynthesis, metal ion and phenylpropanoids related pathways during sugarcane ratoon chlorosis[J]. BMC Plant Biol, 22(1): 1-15.

LYU YZ, DONG XY, HUANG L B, et al., 2017. *De novo* assembly of *Koelreuteria* transcriptome and analysis of major gene related to leaf etiolation[J]. S Afr J Bot, 113(1): 355-361.

MAEKAWA S, Takabayashi A, Reyes TH, et al., 2015. Pale-green phenotype of *atl31 atl6* gouble mutant leaves is caused by disruption of 5-aminolevulinic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS ONE, 10(2): e0117662.

MANJAYA JG, Nandanwar RS, 2007. Genetic improvement of soybean variety JS 80-21 through induced mutations[J]. Plant Mutat Rep, 1(3): 36-40.

MARUM L, MIGUEL A, RICARDO CP, et al., 2012. Reference Gene Selection for Quantitative Real-time PCR Normalization in *Quercus suber*[J]. PLoS ONE,7(4): e35113.

MICHAEL IL, HUBER W, ANDERS S, 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biol, 15(12): 550.

MOCHIZUKI N, BRUSSLAN JA, LARKIN R, et al., 2001. *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (*GUN5*) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction[J]. Proc Nat Acad Sci,98(4): 2053-2058.

OUYANG ZY, OUYANG SL, WU JY, et al., 2021. Research progress of precious commercial tree species *Cyclobalanopsis gilva*[J]. Hunan For Sci Technol, 48(6): 74-79. ［欧阳泽怡, 欧阳硕龙, 吴际友, 等, 2021. 珍贵用材树种赤皮青冈研究进展[J]. 湖南林业科技, 48(6): 74-79.］

QIN ZK, LIU N, ZHOU X, et al., 2023. Phenotypic diversity of *Quercus gilva* natural populations in middle subtropical China[J]. Guihaia, 43(9): 1622-1635. ［秦之旷, 刘娜, 周霞, 等, 2023. 中亚热带赤皮青冈天然种群表型多样性分析[J]. 广西植物, 43(9): 1622-1635.］

SAKURABA Y, PARK SY, PAEK NC, et al., 2015. The divergent roles of staygreen (SGR) homologs in chlorophyll degradation[J]. Mol Cells, 38(5): 390-395.

SMITH-UNNA R, BOURSNELL C, PATRO R, et al., 2016. TransRate: reference-free quality assessment of *de novo* transcriptome assemblies[J]. Genome Res, 26(8): 1134-1144.

SIMÃO FA, WATERHOUSE RM, IOANNIDIS P, et al., 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs[J]. Bioinformatics, 31(19): 3210-3212.

SONG JM, TIAN JC, ZHAO SJ, 1998. Relationship between photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in plants and its regulation[J]. Plant Physiol J, 34(3): 230-238. [宋建民, 田纪春, 赵世杰, 1998. 植物光合碳和氮代谢之间的关系及其调节[J]. 植物生理学通讯, 34(3): 230-238.]

SUN Y, PAN BP, JIE GK, et al., 2022. Dynamic transcriptome and network-based analysis of yellow leaf mutant *Ginkgo biloba*[J]. BMC Plant Biol, 22(1): 465-478.

WANG FF, CHEN NZ, SHEN SH., 2022. iTRAQ-based quantitative proteomics analysis reveals the mechanism of golden-yellow leaf mutant in hybrid paper mulberry[J]. Int J Mol Sci, 23(1): 127.

WANG WL, WANG YX, Li H, et al., 2018. Two MYB transcription factors (CsMYB2 and CsMYB26) are involved in flavonoid biosynthesis in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze][J]. BMC plant biol, 18(1): 288.

WU YN, ZHENG WW, LU WJ, et al., 2021. Research progress on the characteristics and molecular mechanism of yellowing mutation in Brassicaceae[J]. J Zhejiang A F Univ, 38(2): 412-419. ［吴砚农, 郑伟尉, 陆伟杰, 等, 2021. 十字花科植物黄化突变特性及其分子机制研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 38(2): 412-419.］

WU Z J, LI X H, LIU Z W, et al., 2015. Transcriptome-based discovery of *AP2*/*ERF* transcription factors related to temperature stress in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. Funct Integr Genomic, 15(6): 741-52.

WU ZM, ZHANG X, HE B, et al., 2007. A Chlorophyll-deficient Rice mutant with impaired chlorophyllide esteriflcation in chlorophyll biosynthesis[J]. Plant Physiol, 145(1): 29-40.

XIONG XW, WANG YQ, TIAN HZ, et al., 2023. Molecular mechanisms of chlorophyll-reduced cotyledon based on transcriptome sequencing in pumpkin[J]. Acta Agric Zhejiang, 35(1): 90-102.［熊兴伟, 王艺琴, 田怀志, 等, 2023. 基于转录组测序解析南瓜子叶黄化的分子机理[J]. 浙江农业学报, 35(1): 90-102.］

YAMASHITA H, KAMBE Y, OHSHIO M, et al., 2021. Integrated metabolome and transcriptome analyses reveal etiolation-induced metabolic changes leading to high amino acid contents in alight-sensitive Japanese albino tea cultivar[J]. Front Plant Sci, 11(1): 611140.

YANG YX, CHEN XX, XU B, et al., 2015. Phenotype and transcriptome analysis reveals chloroplast development and pigment biosynthesis together influenced the leaf color formation in mutants of *Anthurium andraeanum* ‘Sonate’[J]. Front Plant Sci, 6(1): 139.

ZHANG CY, WANG MH, GAO XZ, et al., 2019. Photosynthetic physiological and histology in novel etiolated branch of the ‘Xiangfeicui’ tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. Mol Plant Breed, 17(23): 7892-7900.［张晨禹, 王铭涵, 高羲之, 等, 2019. 茶树‘湘妃翠’黄化枝光合生理与组织学[J]. 分子植物育种, 17(23): 7892-7900.］

ZHANG H, LI JJ, YOO JH, et al., 2006. Rice *Chlorina-1* and *Chlorina-9* encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development[J]. Plant Mol Biol, 62(3): 325-337.

ZHANG LX, GUO XY, SHI PF, et al., 2021. Effect of water stress on the chlorophyll content and carotenoid content of kenaf leaves during vigorous growing stage[J]. Plant Fiber Sci Chin, 43(2): 80-87.［张丽霞, 郭晓彦, 史鹏飞, 等, 2021. 旺长期水分胁迫对红麻叶片中叶绿素和胡萝卜素含量的影响[J]. 中国麻业科学, 43(2): 80-87.］

ZHAO AG, FANG Y, CHEN XM, et al., 2014. Crystal structure of *Arabidopsis* glutamyl-tRNA reductase in complex with its stimulator protein[J]. Proc Nat Acad Sci, 111(18): 6630-6635.

ZHU LX, ZENG XH, CHEN YL, et al., 2014. Genetic characterisation and fine mapping of a chlorophyll deficient mutant (*BnaC.ygl*) in *Brassica napus*[J]. Mol Breed, 34(2): 603-614.

ZHU MY, 2020. Analysis of photosynthetic characteristics and differentially expressed genes of a tomato yellow leaf mutant LA3734[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University: 31-56.［朱美玉, 2020. 番茄黄叶突变体 LA3734 的光合特性及差异表达基因分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学: 31-56.］